

104
09/980468
PCT/EP 00/05274
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 06/5274

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



4

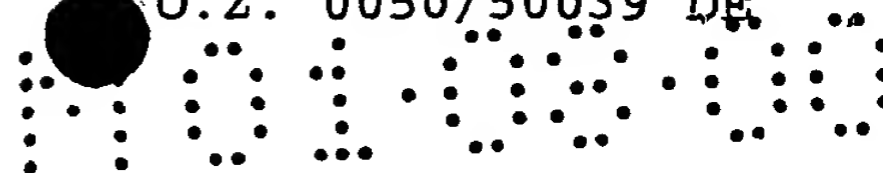
**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 25 718.3
Anmeldetag: 07. Juni 1999
Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE
Bezeichnung: Δ^6 -Acetylenase und Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon*
purpureus
IPC: C 07 K 14/195

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger

 Δ^6 -Acetylenase und Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

Beschreibung

5

Das Enzym Δ^6 -Acetylenase führt in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ ein und/oder konvertiert eine bereits vorhandene *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ in eine Dreifachbindung. Das Enzym Δ^6 -Desaturase führt in

10 Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ ein. Die Erfindung betrifft neue Δ^6 -Acetylenasen und Δ^6 -Desaturasen, ihre Verwendung und ähnlicher Proteine sowie die zugehörigen kodierenden Nukleinsäuren zur Veränderung des Gehaltes und/oder der Struktur von Acyllipiden

15 in Δ^6 -Position, deren Katabolite und/oder deren synthetischer Folgeprodukte in transgenen Zellen und/oder Organismen.

1. Isolierung und Klonierung der Δ^6 -Acetylenase und Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

20

Um DNA-Sequenzen aus *Ceratodon purpureus* zu isolieren, die für eine Δ^6 -Acetylenase und eine Δ^6 -Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von DNA-Sequenzen abgeleitet, die für Δ^5 - (EMBL Accession-Nr. Z81122) und Δ^6 -Fettsäure-Desaturasen (U79010, AJ222980, AF031477 kodieren:

25

Primer A: 5'-TGG TGG AA(A/G) TGG A(A/C)I CA(C/T) AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
WWKW(N/T/K)H(N/K)

30

Primer B: 5'-(T/G)GI TGG AA(A/G) (T/G)(G/A)I (A/C)AI CA(C/T)
AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
(G/W)WK(E/D/W)(N/Q/K)H(N/K)

35

Primer C: 5'-AT (A/T/G/C)T(T/G) (A/T/G/C)GG (A/G)AA (A/T/
G/C)A(A/G) (A/G)TG (A/G)TG -3', reverse primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz (I/M)(H/Q/N)PF(L/F)HH

40 Mittels Polymerasekettenreaction (PCR) mit Einzelstrang-cDNA aus *C. purpureus* wurden mit Primer A und Primer C zwei DNA-Fragmente von 557 bp (Cer3) und 575 bp (Cer16) Länge und mit Primer B und Primer C ein DNA-Fragment von 560 bp (Cer1) Länge amplifiziert. Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt:

45 10 min bei 94°C, Pause für 'hot start' bei 72°C, gefolgt von 32 Zyklen von 20 s bei 94°C, 1 min bei 45°C (Bindungstemperatur, T_m) und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus von 10 min bei 72°C und Stop bei

4°C. Für die Amplifikation wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

Die o.g. doppelsträngigen DNA-Fragmente aus den zwei PCR-Amplifikationen wurden in den pGEM-T Vektor (Promega) legiert, in *E. coli* XL1blue MRF' Kan (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) sequenziert. Die DNA-Teilsequenzen von Cer1 und Cer3 zeigten 70 % Identität. Die o.g. DNA-Teilsequenzen kodierten ohne Primer für offene Leserahmen bei Cer1 von 173 Aminosäuren (Abb. 1, 2), bei Cer 3 von 172 Aminosäuren (Abb. 3, 4) und bei Cer16 von 178 Aminosäuren (Abb. 5, 6). Die abgeleitete Proteinsequenz von Cer1 wies 64 % zu Cer3 und 28 % identische Aminosäuren zu Cer16 auf; Cer 3 und Cer16 wiesen wiederum 27 % identische Aminosäuren auf.

Die höchste Ähnlichkeit der Cer1- und Cer3-Proteine besteht zu der Δ^6 -Acyllipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Girke et al., 1998), während Cer16 die höchste Ähnlichkeit zu der Δ^6 -Acyllipid-Desaturase und der Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase aus höheren Pflanzen aufweist (Abb. 7).

Eine gerichtete λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* wurde von Fritz Thummler, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt (Pasentsis et al., 1998). Es wurde ein PCR-Test dieser *Ceratodon*-Bank durchgeführt, bei dem spezifische Primer von den o.g. DNA-Teilsequenzen Cer1, Cer3 und Cer16 abgeleitet wurden:

Spezifische forward und reverse Primer:

Cer1: 5'-CGAATGAGTGCGACGAAC -3' + 5'-AATAACCTGGGCTCTCAC-3'
30 Cer3: 5'-ATGAGGATATTGATACTCTC-3' + 5'-GCAATCTGGGCATTCACG-3'
Cer16: 5'-GACATCAAAGCTCTTCTC-3' + 5'-GGCGATGAGAAGTGGTTC-3'

Eine Restriktionsanalyse (Hind III bzw. EcoR V) der aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifizierten Produkte zeigte in allen drei Fällen das gleiche Restriktionsmuster wie das der PCR-Amplifikate aus der ss-cDNA, d.h. die *Ceratodon*-cDNA-Bank enthält die drei Klone Cer1, Cer3 und Cer16.

2. cDNA-Bank Screening und Sequenzierung der full length Klone

DNA-Minipräparationen, der drei aus ss-cDNA amplifizierten PCR-Fragmente Cer1, Cer3, Cer16 von ~570 bp Länge in pGEM-T (s.o. unter 1.) wurden für das weitere Screening der vollständigen Klone aus einer λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* an M. Lee und S. Stymne abgegeben. Dieses cDNA-Bank-Screening führte bisher zu zwei vollständigen Klonen von Cer1 und Cer3 mit Inserts von ca. 2,2 kb, die als EcoR I / Kpn I-Fragmente aus dem λ ZAP-Vektor

in die EcoR I / Kpn I-Schnittstellen des puc19-Vektors (New England Biolabs) subkloniert und in *E. coli* JM105 transformiert wurden.

→ Ein weiteres Screening der cDNA-Bank mit Cer1 und Cer3 als Hybridisierungsproben unter niedriger Stringenz zeigte, daß mindestens ein weiterer Cer1-homologer Klon existiert, der evtl. für die Δ^5 -Desaturase kodieren könnte. → Teilsequenz bei M. Lee erfragen!

10 Zwei *E. coli*-Klone, Cer1-50 und Cer3-50, wurden vollständig sequenziert. Cer1-50 hat eine Länge von 2003 bp (Abb. 8) und kodiert für ein offenes Leseraster von 483 Aminosäuren (Abb. 9). Cer3-50 besitzt eine Länge von 2142 bp (Abb. 10) mit einem offenen Leseraster von 520 Aminosäuren (Abb. 11). Beide Protein-
15 sequenzen weisen N-terminal das hochkonservierte HPGG-Motiv des Cytochrom b_5 auf (Lederer, 1994) und C-terminal die für Desaturasen charakteristischen drei Histidin-Boxen auf (Shanklin et al., 1994). Sie stellen somit weitere Mitglieder der wachsenden Familie der Cytochrom b_5 -Fusionsproteine dar (Napier et al.,
20 1999). Das erste Histidin der dritten Box ist gegen Glutamin ausgetauscht, einem weiteren Charakteristikum von Δ^5 - und Δ^6 -Acyl-lipid-Desaturasen sowie Δ^8 -Sphingolipid-Desaturasen.

3. Klonierung und Expression der Δ^6 -Acetylenase und der 25 Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon* in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Klonierung und Expression von Cer1 und Cer3 erfolgte in Anlehnung an die erfolgreiche Expressionmethode des *fad2*-Gens aus *A. thaliana* (Kajiwara et al., 1996), der Δ^8 -Sphingolipid-
30 Desaturase aus *A. thaliana* und *B. napus* (Sperling et al., 1998) und der Δ^5 -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Watts and Browse, 1999) in Hefe.

Die Plasmid-DNA der o.g. vollständigen Klone Cer1 und Cer3 in puc19 (EcoR I / Kpn I) wurde mittels DNA-Minipräparation (Riggs
35 et al., 1986) aus *E. coli* JM105 isoliert. Je 40 bis 50 ng dieser Plasmid-DNA wurde zur PCR-Amplifikation (95°C 3 min, 30 Zyklen á 95°C 45 s, 56°C 30 s, 72°C 90 s, sowie 72°C 10 min und Stop bei 10°C) des offenen Leserasters mit der *pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Für die gerichtete Klonierung in die Kpn I /
40 EcoR I-Schnittstellen des Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) wurden der forward Primer um eine Kpn I- und der reverse Primer um eine EcoR I-Schnittstelle am 5'-Ende der codierenden Region (ATG + Stopcodon fett gedruckt) erweitert:



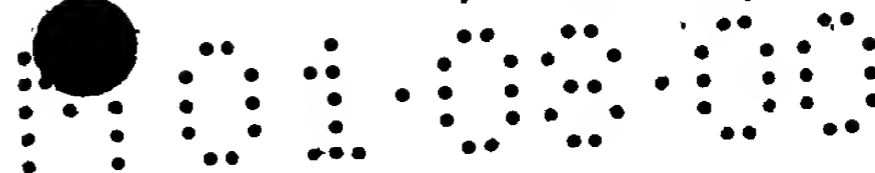
Cer1: 5'- CC GGTACC ATG GCC CTC GTT ACC GAC-3' +
5'- CC GAATTC TTA GTG AGC GTG AAG CCG-3'

Cer3: 5'- CC GGTACC ATG GTG TCC CAG GGC GGC-3' +
5'- CC GAATTC TCA ACT CGC AGC AAG CTG-3'

Mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese wurde die erfolgreiche PCR-Amplifikation der erwarteten DNA-Fragmente von 1468 bp (Cer1) und 1579 bp (Cer3) Länge bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN) aus dem TBE-Agarosegel extrahiert und mit dem Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) in die Sma I-Klonierungsstelle des dephosphorylierten puc 18-Vektors (Pharmacia) subkloniert. Nach Transformation in *E. coli* XL1 blue MRF' Kan (Stratagene) wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs et al., 1986) der Ampicillin-selektierten Transformanten durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) ansequenziert. Die Sequenzdaten bestätigten die vollständige Amplifikation der offenen Leserahmen von Cer1 und Cer3. Des weiteren wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und EcoR I geschnitten und die resultierenden ~1,5 kb KpnI/EcoRI-Fragmente wurden in die KpnI/EcoRI-Stelle des gezippten Hefe-*E. coli* shuttle-Expressionsvektors pYES2 (Invitrogen Co.) legiert. Die daraus resultierenden neuen Plasmide, Cer1/pYES2 und Cer3/pYES2 und wurden in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Co.) transformiert. Die DNA-Maxipräparationen wurden mit dem Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) durchgeführt. Die isolierten Plasmide Cer1/pYES2 und Cer3/pYES2 wurden in *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen Co.) mit der Polyethylenglycol-Methode (Von Pein, 1992) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Agarplatten aus komplettem Minimal-Dropout-Uracil (CM)-Medium mit 2 % Glucose (Asubel et al., 1995). Für den analytischen Vergleich der Transformanten mit dem Hefe-Wildtyp wurde auch der ungeschnittene pYES2-Vektor in INVSc1 (Kontrolle) transformiert.

35

Hefen können neben den eigenen Fettsäuren (16:0, 16:1, 18:0 und 18:1) auch exogene Fettsäuren in ihre Membranlipide inkorporieren (Bossie und Martin, 1989). Um die Substratspezifität der jeweils exprimierten Desaturase zu testen, wurde dem CM-2 % Raffinose-Medium zur Solubilisierung exogener Fettsäuren 1 % Tergitol NP-40 (w/v, Sigma) und 0,003 % der entsprechenden Fettsäure (Stamm-lösung: 0,3 % bzw. 3 % Fettsäure in 5 % Tergitol NP-40, w/v) vor der Inokulation zugegeben. Die Vorkultur erfolgte durch Inokulation von 3 ml CM-2 % Raffinose-Medium/1 % Tergitol NP-40 mit einer transgenen Hefekolonie und anschließender Inkubation für 2 d bei 30°C im Roller bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 4,0 bis 4,3. Für die Hauptkultur wurden 10 ml



CM-2 % Raffinose/1 % Tergitol NP-40-Medium \pm 0,003 % Fettsäure mit einem Aliquot der Vorkultur (200 fache Verdünnung) ad OD₆₀₀ 0,02 angeimpft und 24 h bei 30°C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Induktion der Testkulturen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,5 bis 0,6) durch Zugabe von Galaktose ad 1,8 %. Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte nach weiteren 24 h aeroben Wachstums bei 30°C bei einer OD₆₀₀ von 4,0 bis 4,3.

4. GC-Analyse der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen

10

Die induzierten Hefezellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 g geerntet, in 3 ml Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1 h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) wurden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME wurden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Mono-, Di-, Tri- und Tetraensäuremethylester wurde durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt.

Für die Tri- und Tetraensäuren sind keine Referenzsubstanzen erhältlich. Ihre Identität und die Position der Dreifachbindung wird durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-analysiert.

Die GC-Analysen der FAME aus den transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, mit Cer1/pYES2 (Δ^6 -Acetylenase) und mit Cer3/pYES2 (Δ^6 -Desaturase) transformiert wurden, ist in Tab. 1 dargestellt. Die transgenen Hefezellen wurden ohne exogene Fettsäuren (-) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2), γ -Linolensäure (γ -18:3), α -Linolensäure (α -18:3) oder ω 3-Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Dargestellt ist die Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (Fettdruck, letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Nukleotidsequenzen von Cer1 für eine Δ^6 -Acyllipid-Acetylenase und von Cer3 für eine Δ^6 -Acyllipid-Desaturase aus dem Moos *Ceratodon purpureus* kodieren, welche in transgenen Hefen zur Bildung neuartiger Fettsäuren (Tab.1, Zusammenfassung) führen. Fütterungsversuche mit $\Delta^{11,14}$ -20:2 und $\Delta^{8,11,14}$ -20:3 haben gezeigt, daß diese langkettigen



C₂₀-Fettsäuren zwar inkorporiert, aber nicht in Δ^6 -Position von Cer1 und Cer3 desaturiert werden können. Dies deutet darauf hin, daß die Δ^6 -Acetylenase und die Δ^6 -Desaturase beide auf die Existenz einer Δ^9 -Doppelbindung im Fettsäuresubstrat angewiesen
5 sind.

→ Weitere Fütterungsversuche mit Crepenynsäure ($\Delta^{9,12}$ yn-18:1) und Vernolsäure ($\Delta^{9,12}$ epoxy-18:1) sollen zeigen, ob auch diese Acetylen- bzw. Epoxy-Fettsäure von der Δ^6 -Acetylenase und/oder von der Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon purpurea* als Substrate verwendet
10 werden.

Mit Hilfe einer Δ^6 -Acetylenase wurden Δ^6 -cis-ungesättigte Fettsäuren und Δ^6 -Acetylenfettsäuren hergestellt. Mit Hilfe einer Δ^6 -Desaturase wurden Δ^6 -cis-ungesättigte Fettsäuren hergestellt.
15 Hierzu wurden die für eine Δ^6 -Acetylenase und eine Δ^6 -Desaturase codierenden Gene aus cDNA des Mooses *Ceratodon purpureus* isoliert, in die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kloniert und funktional exprimiert. Die Aktivität dieser Gene konnte *in vivo* durch die Bildung neuartiger Fettsäuren in transgenen Hefen, die mit
20 exogenen Fettsäuren (Linol-, γ -Linolen-, α -Linolen- oder Octadecatetraensäure) als Substrate gefüttert wurden, nachgewiesen werden. Folgende Enzymaktivitäten konnten nachgewiesen werden:

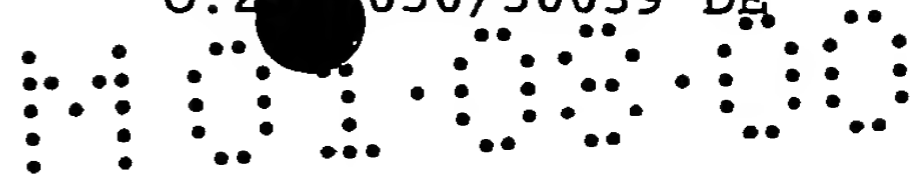
Δ^6 -Acetylenase bzw. Δ^6 -Desaturase :

25	Δ^9 -16:1	→	$\Delta^{6,9}$ -16:2
	Δ^9 -18:1	→	$\Delta^{6,9}$ -18:2
	$\Delta^{9,12}$ -18:2	→	$\Delta^{6,9,12}$ -18:3
	$\Delta^{9,12,15}$ -18:3	→	$\Delta^{6,9,12,15}$ -18:4
	Δ^6 -Acetylenase: $\Delta^{6,9,12}$ -18:3	→	$\Delta^{6\text{yn},9,12}$ -18:3
30	$\Delta^{6,9,12,15}$ -18:3	→	$\Delta^{6\text{yn},9,12,15}$ -18:4

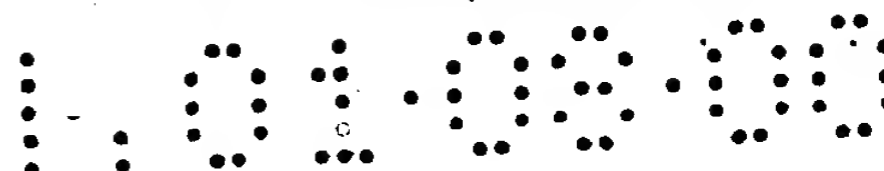
Überraschenderweise weist die Δ^6 -Acetylenase zusätzlich eine cryptische Δ^6 -Desaturaseaktivität auf. In den transgenen Hefen wurden nach Inkorporation exogener Fettsäuresubstrate nicht nur
35 die moostypischen Fettsäuren γ -Linolensäure ($\Delta^{6,9,12}$ -18:3) und Octadec-6-yn-9,12-(Z,Z)-diensäure (Kohn, 1989), sondern auch die in dieser niederen Pflanze nicht vorkommende Hexadec-6,9-(Z,Z)-diensäure und Octadec-6,9-(Z,Z)-diensäure aus den hefeeigenen Δ^9 -Monoensäuren, sowie Octadec-6,9,12,15-(Z,Z,Z,Z)-tetraensäure
40 und Octadec-6yn-9,12,15-(Z,Z,Z)-triensäure aus inkorporierten Fettsäuresubstraten gebildet.

Literatur

- Asubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., Albright L.M., Coen D.M. and Varki A.
5 (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.
- Bossie M.A. and Martin C.E. (1989), Nutritional regulation of yeast Δ^9 fatty acid desaturase activity, *J. Bacteriol.* 171,
10 6409-6413.
- Christie W. W. (1998), Mass spectrometry of fatty acids with methylene-interrupted ene-yne systems, *Chem. Phys. Lipids* 94, 35-41.
15
- Girke T., Schmidt H., Zähringer U., Reski R. and Heinz E. (1998), Identification of a novel Δ^6 -acyl-lipid-desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*, *Plant J.*, in press.
- 20 Girke T., Sperling P., and Heinz E. (1998), Cloning of desaturases with new specificities, in 'Advances in lipid research', J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo and E. Martínez-Force, Secretario de publicaciones de la Universidad de Sevilla, Spain, 103-109.
- 25 Kajiwara S., Shirai A., Fujii T., Toguri T., Nakamura K., and Ohtaguchi K. (1996) Polyunsaturated fatty Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of Ethanol Tolerance and the *FAD2* Gene from *Arabidopsis thaliana*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4309-4313.
- 30 Kohn G. (1989), Untersuchungen zum Lipid- und Fettsäurestoffwechsel von *Riccia fluitans* L. und *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. unter besonderer Berücksichtigung der hochungesättigten C18-Acetylenfettsäuren, *Dissertation*, Universität Mainz.
- 35 Lederer F. (1994) The cytochrome *b*₅-fold: An adaptable molecule, *Biochimie* 76, 674-692.
- Lee M., Lenman M., Banás A., Bafor M., Singh S., Schweitzer M.,
40 Nilsson R., Liljenberg C., Dahlqvist A., Gummesson P.-O., Sjö Dahl S., Green A., Stymne S. (1998), Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation, *Science* 280, 915-918.



- Napier J.A., Sayanova O., Sperling P. and Heinz E. (1999),
A growing family of cytochrome b₅-domain fusion proteins, *Trends
in Plant Science* 4(1), 2-4.
- 5 Pasentsis K., Paulo N., Algarra P., Dittrich P., Thummler F.
(1998), Characterization and expression of the phytochrome gene
family in the moss *Ceratodon purpureus*, *Plant J.* 13(1), 51-61.
- Riggs M. G. and McLachlan (1986) A simplified screening procedure
10 for large numbers of plasmid mini-preparation, *BioTechniques* 4:
310-313.
- Sayanova O., Smith M.A., Lapinskas P., Stobart A.K., Dobson G.,
Christie W.W., Shewry P.R., and Napier J.A. (1997) Expression
15 of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome
b₅ domain results in the accumulation of high levels of
 Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco, *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA* 94: 4211-4216.
- 20 Shanklin J., Whittle E., and Fox B.G. (1994) Eight Histidine
Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated
Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in
Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase, *Biochemistry* 33:
12787-12794.
- 25 Sperling P., Zähringer U., and Heinz E. (1998), A sphingolipid
desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome
b₅ fusion protein, *J. Biol. Chem.* 273, 28590-28596.
- 30 Von Pein M. (1992), Ph. D. thesis, Heinrich Heine-Universität,
Düsseldorf.
- Watts J.L. and Browse J. (1999), Isolation and characterization
of a Δ^5 -fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*, *Arch.*
35 *Biochem. Biophys.* 362 (1), 175-182.



Legenden

Abb. 1: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer1

5 Abb. 2: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer1

Abb. 3: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer 3

Abb. 4: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer3

10

Abb 5: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer16

Abb. 6: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer16

15 Abb. 7: Aminosäure-Alignment von Cer1, Cer3 und Cer16 mit Desaturasen und modifizierenden Enzymen, gruppiert in einem Phylogramm nach unterschiedlichen Regioselektivitäten (mit den Programmen CLUSTALX and Treeview). Die Regioselektivitäten sind durch Zahlen markiert (vereinfacht als Δ -Desaturasen) und deren Kompartimentierung (PL = plastidär, ER = mikrosomal). Cytochrome b_5 -Fusionsproteine und exotische Modifikationen (Hydroxylierung, Epoxidierung, Acetylierung) werden durch gepunktete bzw. gestrichelte Zweige angezeigt. EMBL Accession numbers (Girke, Sperling und Heinz, 1998).

20

25

Abb. 8: Nukleotidsequenz (2003 bp) der $\Delta 6$ -Acetylenase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und poly A.

30

Abb. 9: Deduzierte Aminosäuresequenz (483 aa) der $\Delta 6$ -Acetylenase aus *C. purpureus*.

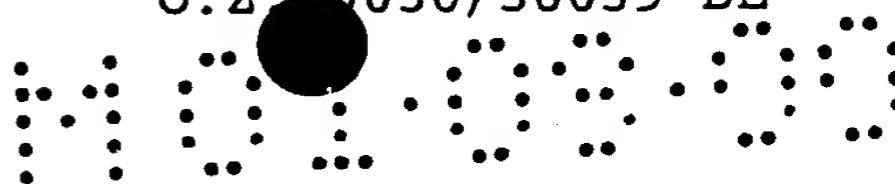
Abb. 10: Nukleotidsequenz (2142 bp) der $\Delta 6$ -Desaturase aus *C. purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen.

35

Abb. 11: Deduzierte Aminosäuresequenz (520 aa) der $\Delta 6$ -Desaturase aus *C. pupureus*.

40

45



Tab. 1: GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, der $\Delta 6$ -Acetylenase (Cer1/pYES2) und der $\Delta 6$ -Desaturase (Cer3/pYES2) transformiert wurden. Die transgenen Hefezellen wurden ohne exogenen Fettsäuren (-) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2), γ -Linolensäure (γ -18:3), α -Linolensäure (α -18:3) oder $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

15 Abb. 1

CATTCATCATACTGCTCCGAATGAGTGCGACGAACAGTACACACCTCTAG
ACGAAGACATTGATACTCTCCCCATCATTGCCTGGAGCAAGGAAATTTTG
GCCACCGTTGAGAGCAAGAGAATTTTGCGAGTGCTTCGATATCAGCACTA
20 CATGATTCTGCCTCTATTGTTTCATGGCCCGGTACAGTTGGACTTTTGGA
GTTTGCTCTTCACATTCAATCCTGATTTGAGCACGACCAAGGGATTGATA
GAGAAGGGAACAGTTGCTTTTCACTACGCCTGGTTCAGTTGGGCTGCGTT
CCATATTTTGCCGGGTGTCGCTAAGCCTCTTGCGTGGATGGTAGCAACTG
AGCTTGTTGGCCGGTTTGTGTTGGGATTTCGTGTTTACGTTGAGTCACAAT
25 GGAAAGGAGGTTTACAATGAATCGAAGGACTTCGTGAGAGCCCAGGTTAT
TACCACCCGTAACACCAAGCGAGGCTGGTTCAACGATTGGTTCACTGGGG
GACTCGACACCCAGATTGAG

Abb. 2

30

IHHTAPNECDEQYTPLDEDIDTLPIIAWSKEILATVESKRILRVLQYQHY
MILPLLFMARYSWTFGSLLFNFNPDLSSTTKGLIEKGTVAFHAWFSWAAF
HILPGVAKPLAWMVATELVAGLLLGFVFTLSHNGKEVYNESKDFVRAQVI
TTRNTKRGWFNDWFTGGLDTQIE

35

40

45

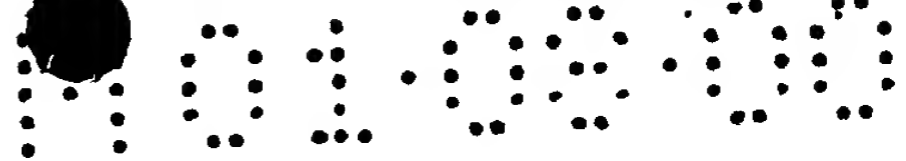


Abb. 3

CCTGCATCATGCTGCTCCGAATGAATGCGACCAAAGTACACGCCGATTG
ATGAGGATATTGATACTCTCCCATCATTTGCTTGGAGTAAAGATCTCTTG
5 GCCACTGTTGAGAGCAAGACCATGTTGCGAGTTCTTCAGTACCAGCACCT
ATTCTTTTTTGGTTCTTTTGACGTTTGCCCGGGCGAGTTGGCTATTTTGA
GCGCGGCCTTCACTCTCAGGCCCCGAGTTGACCCTTGGCGAGAAGCTTTTG
GAGAGGGGAACGATGGCTTTGCACTACATTTGGTTTAATAGTGTTGCGTT
TTATCTGCTCCCCGGATGGAAACCAGTTGTATGGATGGTGGTCAGCGAGC
10 TCATGTCTGGTTTCCTGCTGGGATACGTATTTGTACTCAGTCACAATGGA
ATGGAGGTGTACAATACGTCAAAGGACTTCGTGAATGCCAGATTGCATC
GACTCGCGACATCAAAGCAGGGGTGTTTAATGATTGGTTCACCGGAGGTC
TCAACAGACAGATT

15 Abb. 4

LHHAAPNECDQKYTPIDEDIDTLPIIAWSKDLLATVESKTMRLVLQYQHL
FFLVLLTFARASWLFWSAAFTLRPELTLGEKLLERGTMALHYIWFNSVAF
YLLPGWKPVVWMVSELMSGFLLGYVFLSHNGMEVYNTSKDFVNAQIAS
20 TRDIKAGVFNDWFTGGLNRQIE

Abb. 5

TGCTCATCACATCGCCTGTAATAGTATAGAATATGATCCAGACCTACAGT
25 ACATCCCCCTTTTTGCAGTGACATCAAAGCTCTTCTTAACCTCTACTCC
TACTTCTATGAAAGGGTTATGCCATTCGATGGCGTAGCACGCTCTCTGAT
TGCCTACCAGCACTGGACGTTTTATCCAATAATGGCTGTTGCTCGGGTGA
ACCTCTTTGCCCAATCCCTTCTAGTACTGACCTCGAAGAAGCATGTGCCA
GACAGGTGGCTTGAGCTCGGTGCTATCGGTTTCTTCTACCTGTGGTTCTT
30 CACCCTCTTGTCGTACCTGCCCCACTGCACCGGAGAGGCTTGCTTTTCGTCC
TTGTCAGTTTTTGAGTGACAGGGATCCAGCATGTACAGTTTTGCCTGAAC
CACTTCTCATCGCCGGTTTATCTAGGACAGCCGAAGAGCAAGGCTTGGGT
TGAATCTCAAGCACGGGGCACTCTCAATCTCTCTACACCGGCTTACATGG
ATTGGTTTCACGGGGGTCTTCAGTTCCAGATCGAG

35

Abb. 6

AHHIACNSIEYDPDLQYIPLFAVTSKLFNSLYSYFYERVMPFDGVARSLI
AYQHWTFYPIMAVARVNLFAQSLVLTSKKHVPDRWLELGAIGFFYLWFF
40 TLLSYLPTAPERLAFVLVSFAVTGIQHVQFCLNHFSSPVYLGQPKSKAWV
ESQARGTLNLSTPAYMDWFHGGGLQFQIE

401.05.00

12

Abb. 7

5

10

15

20

25

30

35

40

45

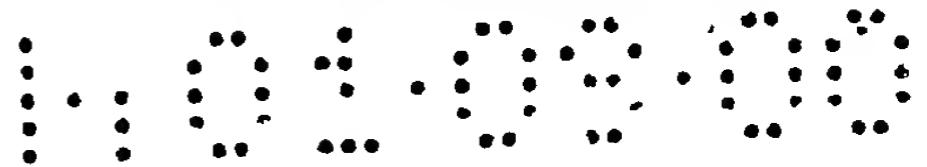


Abb. 8

CTCAGGCAGGTCTCAGTTGATGAGACGCTGAGTTCTGAATCCTTTGAGCT
GTGTCAGGCTCGGCACTTGTGGGATGGTGAAGGAGTGATCGATCAGGAGT
5 GCAGGAGCTGCATTAGTTTCTCAGGGTCGATCAGGTTATTCTGAAAAAGG
CTGCGTCTGTGAGCAGTTTGCAAAAATGGCCCTCGTTACCGACTTTCTGA
ACTTTCTGGGCACGACATGGAGCAAGTACAGCGTGTACACCCATAGCTAT
GCTGGAACTATGGGCCTACTTTGAAGCACGCCAAAAAGGTTTCTGCTCA
AGGTAAACTGCGGGACAGACACTGAGACAGAGATCGGTGCAGGACAAAA
10 AGCCAGGCACTTACTCTCTGGCCGATGTTGCTTCTCACGACAGGCCTGGA
GACTGCTGGATGATCGTCAAAGAGAAGGTGTATGATATTAGCCGTTTTGC
GGACGACCACCCTGGAGGGACGGTAATTAGCACCTACTTTGGGCGGGATG
GCACAGACGTTTTTCGCAACATTCCATCCACCTGCCGCATGGAAGCAACTC
AATGACTACTACATTGGAGACCTTGCTAGGGAAGAGCCCCTTGATGAATT
15 GCTTAAAGACTACAGAGATATGAGAGCCGAGTTTGTTAGAGAAGGGCTTT
TCAAGAGTTCCAAGGCCCTGGTTCCTGCTTCAGACTCTGATTAATGCAGCT
CTCTTTGCTGCGAGCATTGCGACTATCTGTTACGACAAGAGTTACTGGGC
TATTGTGCTGTCAGCCAGTTTGATGGGTCTCTTCGTCCAACAGTGTGGAT
GGCTTGCCCATGATTTCTTCATCAACAGGTCTTTGAGAACCGTACCGCG
20 AACTCCTTCTTTGGCTATTTGTTTCGGCAATTGCGTGCTTGGCTTTAGTGT
ATCATGGTGGAGGACGAAGCACAAACATTCATCATACTGCTCCGAATGAGT
GCGACGAACAGTACACACCTCTAGACGAAGACATTGATACTCTCCCCATC
ATTGCCTGGAGCAAGGAAATTTTGGCCACCGTTGAGAGCAAGAGAATTTT
GCGAGTGCTTCAATATCAGCACTACATGATTCTGCCTCTATTGTTTCATGG
25 CCCGGTACAGTTGGACTTTTGGAAGTTTGCTCTTCACATTCAATCCTGAT
TTGAGCACGACCAAGGGATTGATAGAGAAGGGAACAGTTGCTTTTCACTA
CGCCTGGTTCAGTTGGGCTGCGTTCCATATTTTGCCGGGTGTCGCTAAGC
CTCTTGCGTGGATGGTAGCAACTGAGCTTGTGGCCGGTTTGTTGTTGGGA
TTCGTGTTTACGTTGAGTCACAATGGAAAGGAGGTTTACAATGAATCGAA
30 GGACTTCGTGAGAGCCCAGGTTATTACCACCCGTAACACCAAGCGAGGCT
GGTTC AACGATTGGTTC ACTGGGGGACTCGACACCCAGATTGAGCATCAC
CTGTTTCCAACAATGCCAGGCACA ACTACCCCAAGATCGCACCTCAGGT
CGAGGCTCTTTGCAAGAAGCACGGCCTCGAGTACGATAATGTCTCCGTCTG
TTGGTGCCTCTGTCTCGCGGTTGTGAAGGCGCTCAAGGAAATTGCTGATGAA
35 GCGTCAATTCGGCTTCACGCTCACTAAGAAATCGTCGAACTTTGACTATT
CATTTTTTTTCGCCTGGCTACCTCAAATGTTTCGGGAGCAGGTGCTTGGCAG
TGTGTTCAACCGGAGCGCACTGAAAAATGTGCAGAATCCATTTCAGAAAT
TACCATTCCCTAGCTAAATCTTCTTTTTTACCAGGTCGGATATATGAACTT
TTTTGATGCAACAAGTAGCATTCAATTGAAGACATTGTTTCGAGATATAAT
40 TCGCAGTGTTTCTATTTCAGCGGGCATACGTACTAGTCCATATCGGCGGTT
GCCGAGAGTTTACATTATTAGTTGGCACAACGAGTAGATCTAGTGTAAT
TTCTATTTCCGCATGTAATATTACTCTGAATATATACCGTTATCTATTTT
CCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA



Abb. 9

MALVTDFLNF LGTTWSKYSV YTHSYAGNYG PTLKHAKKVS AQGKTAGQTL
RQRSVQDKKP GTYSLADVAS HDRPGDCWMI VKEKVYDISR FADDHPGGTV
5 ISTYFGRDGT DVFATFHPPA AWKQLNDYYI GDLAREEPLD ELLKDYRDMR
AEFVREGLFK SSKAWFLLQT LINAALFAAS IATICYDKSY WAIVLSASLM
GLFVQQCGWL AHDFLHQQVF ENRTANSFFG YLFGNCVLGF SVSWWRTKHN
IHHTAPNECD EQYTPLDEDI DTLPIIAWSK EILATVESKR ILRVLQYQHY
MILPLLFMAR YSWTFGSLLE TFNPDLSTTK GLIEKGTVAF HYAWFSWAAF
10 HILPGVAKPL AWMVATELVA GLLLG FVFTL SHNGKEVYNE SKDFVRAQVI
TTRNTKRGWF NDWFTGGLDT QIEHHLFPTM PRHNYPKIAP QVEALCKKHG
LEYDNVSVVG ASVAVVKALK EIADEASIRL HAH

15

20

25

30

35

40

45

Abb. 10

CGGAG GTCTCTTGTC GTTCTTGGAG
TCTGTGTCGA GCTTGGAATG CGGTAGGCGC GGCCGTTTCG TGGTTTTTGGC
5 GTTGGCATTG CGCGAGGGCG GACAGTGGGA GTGCGGGAGG TCTGTTTGTG
CATGACGAGG TGGTTGTAAT CTTCGCCGGC AGAATGGTGT CCCAGGGCGG
CGGTCTCTCG CAGGGTTCCA TTGAAGAAAA CATTGACGTT GAGCACTTGG
CAACGATGCC CCTCGTCAGT GACTTCCTAA ATGTCCTGGG AACGACTTTG
GGCCAGTGGA GTCTTTCCAC TACATTCGCT TTCAAGAGGC TCACGACTAA
10 GAAACACAGT TCGGACATCT CGGTGGAGGC ACAAAAAGAA TCGGTTGCGC
GGGGGCCAGT TGAGAAATATT TCTCAATCGG TTGCGCAGCC CATCAGGCGG
AGGTGGGTGC AGGATAAAAA GCCGGTACT TACAGCCTGA AGGATGTAGC
TTCGCACGAT ATGCCCCAGG ACTGCTGGAT TATAATCAAA GAGAAGGTGT
ATGATGTGAG CACCTTCGCT GAGCAGCACC CTGGAGGCAC GGTATCAAC
15 ACCTACTTCG GACGAGACGC CACAGATGTT TTCTCTACTT TCCACGCATC
CACCTCATGG AAGATTCTTC AGAATTTCTA CATCGGGAAC CTTGTTAGGG
AGGAGCCGAC TTTGGAGCTG CTGAAGGAGT ACAGAGAGTT GAGAGCCCTT
TTCTTGAGAG AACAGCTTTT CAAGAGTTCC AAATCCTACT ACCTTTTCAA
GACTCTCATA AATGTTTCCA TTGTTGCCAC AAGCATTGCG ATAATCAGTC
20 TGTACAAGTC TTACCGGGCG GTTCTGTTAT CAGCCAGTTT GATGGGCTTG
TTTATTCAAC AGTGCGGATG GTTGTCTCAC GATTTTCTAC ACCATCAGGT
ATTTGAGACA CGCTGGCTCA ATGACGTTGT TGGCTATGTG GTCGGCAACG
TTGTTCTGGG ATTCAGTGTC TCGTGGTGGA AGACCAAGCA CAACCTGCAT
CATGCTGCTC CGAATGAATG CGACCAAAG TACACACCGA TTGATGAGGA
25 TATTGATACT CTCCCCATCA TTGCTTGAG TAAAGATCTC TTGGCCACTG
TTGAGAGCAA GACCATGTTG CGAGTTCTTC AGTACCAGCA CCTATTCTTT
TTGGTTCTTT TGACGTTTGC CCGGGCGAGT TGGCTATTTT GGAGCGCGGC
CTTCACTCTC AGGCCCCGAGT TGACCCTTGG CGAGAAGCTT TTGGAGAGGG
GAACGATGGC TTTGCACTAC ATTTGGTTTA ATAGTGTTGC GTTTTATCTG
30 CTCCCCGGAT GGAAACCAGT TGTATGGATG GTGGTCAGCG AGCTCATGTC
TGGTTTCCTG CTGGGATACG TATTTGTACT CAGTCACAAT GGAATGGAGG
TGTACAATAC GTCAAAGGAC TTCGTGAATG CCCAGATTGC ATCGACTCGC
GACATCAAAG CAGGGGTGTT TAATGATTGG TTCACCGGAG GTCTCAACAG
ACAGATTGAG CATCATCTAT TTCCAACGAT GCCCAGGCAC AACCTTAATA
35 AAATTTCTCC TCACGTGGAG ACTTTGTGCA AGAAGCATGG ACTGGTCTAC
GAAGACGTGA GCATGGCTTC GGGCACTTAC CGGGTTTGA AAACACTTAA
GGACGTTGCC GATGCTGCTT CACACCAGCA GCTTGCTGCG AGTTGAGGCA
TCGCAGCACT CGTCGAAACA TTTTGTCTG TTATAGTGTT CATATGTGAT
CGAGGGGAAA AGGTCCCATG CTCTGATCTA TTCTTCTGTA GCCAATATTT
40 TTCAATTGAA AGGAGGTTCC TCACTTATCT TCCATCTATC GTTGCACATC
CTGCATCAGA GTTAGCGTTG GAGTAATGTT AAGCACTTGT AGATTATGCC
CACCATTGCC ACATTTCTGT TCGGTTACAA TCGTTTGATT CCATGCTATC
CTCCGTGTTT ATCTCGTTGT TATAAGCAAG CTTGAAAAAA CATGCTACGA
GATTGGCAGA CGTTGTCTTG GCAGCTGTAG AGGTTGGTTC CATTCATTGT
45 GTAGTACAGA ACTCTCTCGT CCCTGTTTCT CTACATTACT TGTTACATAG
TGACTTTCAT TCACAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAA

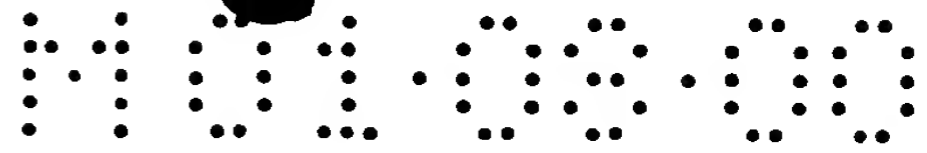


Abb. 11

MVSQGGGLSQ GSIEENIDVE HLATMPLVSD FLNVLGTTLG QWSLSTTFAF
KRLTTKKHSS DISVEAQKES VARGPVENIS QSV AQPIRRR WVQDKKPVTY
5 SLKDVASHDM PQDCWIIKE KVDVSTFAE QHPGGTVINT YFGRDATDVF
STFHASTSWK ILQNFYIGNL VREEPTLELL KEYRELRALF LREQLFKSSK
SYL FKT LIN VSIVATSI AI ISLYKSYRAV LLSASLMGLF IQQCGWLSHD
FLHHQVFETR WLNDVVG YVV GNVVLGFSVS WWKTKHNLHH AAPNECDQKY
TPIDEDIDTL PIIAWSKD LL ATVESKTMLR VLQYQHLFFL VLLTFARASW
10 LFWSAAFTLR PELTLGEKLL ERGTMALHYI WFNSVAFYLL PGWKPVVWMV
VSELMSGFLL GYVFVLSHNG MEVYNTSKDF VNAQIASTRD IKAGVFNDWF
TGGLNRQIEH HLFPTMPRHN LNKISPHVET LCKKHGLVYE DVSMASGTYR
VLKTLKD VAD AASHQQLAAS

15

20

25

30

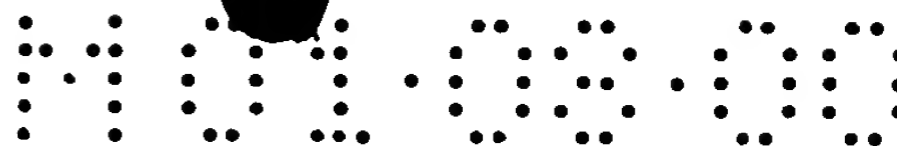
35

40

45

Tab. 1

Fatty acids [mol %]	pYES2					Cer1/pYES2					Cer3/pYES2				
	—	18:2	γ-18:3	α-18:3	18:4	—	18:2	γ-18:3	α-18:3	18:4	—	18:2	γ-18:3	α-18:3	18:4
16:0	26.2	24.1	27.8	27.4	32.7	24.2	23.1	26.2	25.7	26.5	26.5	23.3	28.1	29.2	29.6
16:1 ⁹	41.8	9.6	27.4	27.3	16.1	36.5	13.3	24.7	28.8	21.9	43.8	9.9	25.2	34.0	20.9
16:2 ^{6,9}						6.9	1.8	3.3	5.3	3.0	1.1		0.1	0.8	0.1
18:0	6.5	5.3	6.1	6.1	7.9	6.4	6.1	6.6	6.5	7.1	5.5	5.3	6.3	5.8	5.9
18:1 ⁹	23.6	4.9	15.1	14.8	11.3	24.9	8.8	15.6	20.0	16.8	21.4	5.3	15.7	14.3	11.5
18:2 ^{6,9}						0.3		0.2	0.3	0.2	0.1			0.1	
18:2 ^{9,12}		53.9					41.9					42.3			
18:3 ^{6,9,12}			19.5				0.8	16.1				8.1	21.2		
18:3 ^{9,12,15}				22.8					10.0					11.9	
18:4 ^{6,9,12,15}				28.8					1.7	21.3				1.9	30.1
18:3 ^{6yn,9,12}							1.3	4.6							
18:4 ^{6yn,9,12,15}										2.3					
Σ Des. [mol %]	—	—	—	—	—	7.2	3.9	8.1	7.3	5.5	1.2	8.1	0.1	2.8	0.1



Patentansprüche

1. Protein enthaltend die in Abb. 2 dargestellte Aminosäure-
5 sequenz.
2. Protein enthaltend die in Abb. 4 dargestellte Aminosäure-
sequenz.
- 10 3. Protein enthaltend die in Abb. 6 dargestellte Aminosäure-
sequenz.
4. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 zur Her-
stellung von ungesättigten Fettsäuren.
- 15 5. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, indem
man gesättigte Fettsäuren mit mindestens einem der Proteine
gemäß Anspruch 1 bis 3 inkubiert.

20

25

30

35

40

A 0 1 0 9 0 0

Δ^6 -Acetylenase und Δ^6 -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft neue Delta-6 Acetylenasen und -Desaturasen und deren Verwendung.

10

15

20

25

30

35

40

45